

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/31, C12Q 1/68, G01N 33/569, C12P 21/08, C12N 15/52	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/14961 (43) Date de publication internationale: 7 juillet 1994 (07.07.94)
--	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01264 (22) Date de dépôt international: 17 décembre 1993 (17.12.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/15671 18 décembre 1992 (18.12.92) FR 93/08356 7 juillet 1993 (07.07.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ARTHUR, Michel [CH/FR]; 9, rue du Faubourg-Saint-Martin, F-75010 Paris (FR). DUTKA-MALEN, Sylvie [FR/FR]; 1, sentier des Rossignols, F-94260 Fresnes (FR). EVERS, Stefan [DE/FR]; 12, rue Abel-Hovelacque, F-75013 Paris (FR). COURVALIN, Patrice [FR/FR]; 13, rue Emile-Duclaux, F-75015 Paris (FR). (74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).	(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.
---	--

(54) Title: PROTEIN CONFERRING AN INDUCIBLE RESISTANCE TO GLYCOPEPTIDES, PARTICULARLY IN GRAM-POSITIVE BACTERIA

(54) Titre: PROTEINE CONFERANT UNE RESISTANCE DE TYPE INDUCTIBLE A DES GLYCOPEPTIDES, NOTAMMENT CHEZ DES BACTERIES A GRAM-POSITIF

(57) Abstract

The invention relates to a protein VanB involved, in Gram-positive bacteria, in resistance to glycopeptides, particularly to vancomycin, said resistance being of the type inducible by the vancomycin and non-inducible by teicoplanin. The invention also relates to the utilisation of fragments of nucleotides of the gene van B for the detection of resistances to glycopeptides.

(57) Abrégé

L'invention concerne une protéine VanB impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine. L'invention vise aussi l'utilisation de fragments de nucléotides du gène van B pour la détection de résistances à des glycopeptides.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

PROTEINE CONFERANT UNE RESISTENCE DE TYPE INDUCTIBLE, A DES GLYCOPEPTIDES,
NOTAMMENT CHEZ DES BACTERIES A GRAMPOSITIF

L'invention concerne les polypeptides associés à l'expression d'une résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine, notamment chez des bactéries à Gram-positif, en particulier de la famille des cocci à Gram-positif. L'invention vise également une séquence nucléotidique codant pour ces polypeptides. Elle concerne aussi l'utilisation de ces polypeptides et de leur séquence nucléotidique en tant que moyens de détection in vitro d'une résistance à des glycopeptides. Parmi les cocci à Gram-positif, l'invention vise tout particulièrement les entérocoques, les streptocoques et les staphylocoques.

Les glycopeptides, parmi lesquels la vancomycine et la teicoplanine, sont des antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne. Ces antibiotiques sont très utilisés pour le traitement des infections sévères dues à des cocci à Gram-positif (entérocoques, streptocoques et staphylocoques), en particulier dans les cas d'allergie et de résistance aux pénicillines.

Jusqu'en 1986, la vancomycine s'est avérée efficace contre la quasi-totalité des souches d'entérocoques.

L'activité des glycopeptides dépend de la formation d'un complexe entre l'antibiotique et les précurseurs du peptidoglycane, plus que de l'interaction directe avec des enzymes du métabolisme de la paroi cellulaire. En particulier on a constaté

que les glycopeptides se fixent aux résidus terminaux D-alanyl-D-alanine (D-ala-D-ala) des précurseurs du peptidoglycane.

Plusieurs phénotypes de résistance aux glycopeptides ont été mis en évidence ; on a notamment distingué des souches résistantes à un haut niveau de glycopeptides et les souches résistantes à un bas niveau de concentration.

Par souche résistante à un haut niveau, on entend une souche de bactérie en particulier une souche de cocci à Gram-positif pour laquelle les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de vancomycine et de teicoplanine sont respectivement supérieures à 32 et 8 $\mu\text{g/ml}$. Les CMI de la vancomycine vis à vis des souches résistantes à bas niveau sont comprises entre 8 et 32 $\mu\text{g/ml}$. Le phénotype VanB est caractérisé par une résistance inductible par la vancomycine, mais non inductible par la teicoplanine. Une fois induite, cette résistance peut exister vis à vis de différents glycopeptides, en particulier vis à vis de la vancomycine et/ou de la teicoplanine, et ce à des niveaux variables.

Les souches d'entérocoques répondant au phénotype VanB (classe B) sont notamment des souches de E.faecalis et E.faecium.

Al-Obeid S. et al (FEMS Microbiology Letters 70 (1990) 101-106) ont ainsi comparé les protéines de résistance à des glycopeptides, inductibles par la vancomycine, chez quatre souches Enterococci, et ont déduit de leur comparaison, l'existence de trois types de protéines, l'un de ces types étant présent chez la souche E.faecium résistante à bas niveau de vancomycine. Selon les auteurs de cette publication, une protéine de poids moléculaire d'environ 39,5 kDa serait induite chez les souches à bas niveau de

résistance et cette résistance serait liée à une induction par la vancomycine. Ces souches présenteraient aussi une résistance à la teicoplanine, également induite par la vancomycine.

D'après Al-Obeid et al, cette protéine de 39,5 kDa serait présente sous de multiples formes mais la nature de cette multiplicité n'a pas été étudiée. Selon ces auteurs, il pourrait exister une spécificité de structure en fonction des espèces concernées de bactéries et du niveau de résistance, ce qui demande à être confirmé.

Dans cette publication, Al-Obeid et al ont décrit 11 acides aminés de la séquence N-terminale de cette protéine de 39,5 kDa et ont observé que cette séquence comportait environ 70% d'homologie avec de nombreuses protéines de membrane d'origine procaryote ou eucaryote, ayant des fonctions diverses. Cette comparaison ne permettait pas selon les auteurs d'établir la fonction éventuelle de la protéine. Enfin Al-Obeid et al ont remarqué que d'autres protéines sont induites, à un degré moindre cependant.

L'invention concerne des peptides, polypeptides ou protéines impliqués dans l'expression d'une résistance à des antibiotiques de la famille des glycopeptides et notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ainsi que les séquences nucléotidiques codant pour de tels polypeptides. La résistance dont il est question ci-dessus est de type inductible par la vancomycine et non par la teicoplanine.

Les expressions "impliqué dans l'expression d'une résistance" ou "impliqué dans une résistance" signifient que la protéine de l'invention est nécessaire pour que se manifeste la résistance.

L'invention vise également des sondes nucléotidiques utilisables pour la détection d'une

résistance aux glycopeptides, notamment par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), ou par des tests faisant intervenir des anticorps.

L'invention a donc pour objet une protéine VanB caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'acides aminés suivante I, et en ce qu'elle participe à la résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non par la teicoplanine, chez des bactéries à Gram-positif.

M N K I K V A I I F G G C S E E H D V S V K S A I E I A
 A N I N T E K F D P H Y I G I T K N G V W K L C K K P C
 T E W E A D S L P A I F S P D R K T H G L L V M K E R E
 Y E T R R I D V A F P V L H G K C G E D G A I Q G L F E
 L S G I P Y V G C D I Q S S A A C M D K S L A Y I L T K
 N A G I A V P E F Q M I E K G D K P E A R T L T Y P V F
 V K P A R S G S S F G V T K V N S T E E L N A A I E A A
 G Q Y D G K I L I E Q A I S G C E V G C A V M G N E D D
 L I V G E V D Q I R L S H G I F R I H Q E N E P E K G S
 E N A M I I V P A D I P V E E R N R V Q E T A K K V Y R
 V L G C R G L A R V D L F L Q E D G G I V L N E V N T L
 P G F T S Y S R Y P R M A A A A G I T L P A L I D S L I
 T L A I E R

Par l'expression "résistance inductible" on entend la capacité pour une bactérie à Gram-positif déterminée, en particulier pour une souche Enterococcus déterminée, de produire une protéine VanB en présence d'une concentration 0,05 à 1 μ l/ml de vancomycine.

La résistance à un ou plusieurs glycopeptides déterminés peut se traduire par la persistance d'une infection due à des germes habituellement sensibles aux glycopeptides, ou peut être détectée au moyen d'un antibiogramme (surtout pour les hauts niveaux de

résistance), de la CMI, de l'hybridation avec des sondes (après amplification par exemple par PCR).

Selon un premier mode particulier de réalisation de l'invention, la protéine VanB est caractérisée en ce qu'elle est impliquée dans une résistance de type inductible à des glycopeptides et en particulier à la vancomycine, chez des entérocoques et par exemple chez des souches du genre E. faecium ou E. faecalis.

L'invention concerne également une protéine VanB caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acides aminés modifiée par rapport à la séquence I, par délétion, insertion, ou remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, dès lors que la protéine VanB ainsi modifiée est impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine, et non inductible par la teicoplanine.

Entre également dans le cadre de l'invention, tout fragment peptidique de la protéine VanB caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence d'acides aminés I ou à toute partie de cette séquence fonctionnellement associée à la résistance de type inductible à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, chez des bactéries à Gram-positif, par exemple des bactéries de la famille des enterocoques.

Avantageusement des fragments peptidiques de l'invention présentent en outre ou alternativement, des propriétés antigéniques et sont donc reconnus par des anticorps formés contre la protéine VanB.

Un fragment particulier de la séquence I correspond par exemple à la séquence suivante, ou comprend cette séquence :

L F E L S G I P Y V G C D I Q S S A A C M D K S L A Y I
L T K N A G I A V P E F Q M I E K G D K P E A R T L T Y
P V F V K P A R S G S S F G V T K V N S T E E L N A A I
E A A G Q Y D G K I L I E Q A I S G C E V G C A V M G N
E D D L I V G E V D Q I R L S H G I F R I H Q E N E P E
K G S E N A M I I V P A D I P V E E R N R V Q E T A K K
V Y R V L G C R G L A R V D L F L Q E D G G I V L N E V

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, ces antigènes sont spécifiques de la protéine VanB et ne sont donc pas reconnus par des anticorps reconnaissant les protéines VanA et VanC telles que décrites dans la demande de brevet EP 91920753.

L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine VanB impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine, ladite protéine VanB comprenant la séquence d'acides aminés I, ou en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADN complémentaire de cette séquence codante, ou d'une séquence d'ARN correspondante.

Par séquence complémentaire, on entend toute séquence d'ADN dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la séquence I, et dont l'orientation est inversée.

Une séquence nucléotidique particulière répondant à cette définition est caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement de nucléotides II suivant ou un enchaînement nucléotidique modifié par rapport à II, dès lors qu'il code pour une protéine impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette

résistance étant de type inductible par la vancomycine
et non inductible par la teicoplanine.

GAGCGTGTGCTGCGAGATACCACAGAAAACAATCAGAATTGTCTTAACCTTTGAAA
GGAGTTTACAGCATGAATAAAATAAAAGTCGCAATTATCTTCGGCGGTTGCTCGG
AGGAACATGATGTGTGCGGTAAAATCCGCAATAGAAATTGCTGCGAACATTAATAC
TGAAAAATTTCGATCCGCACTACATCGGAATTACAAAAACGGCGTATGGAAGCTA
TGCAAGAAGCCATGTACGGAATGGGAAGCCGATAGTCTCCCCGCCATATTCTCCC
CGGATAGGAAAACGCATGGTCTGCTTGTTCATGAAAGAAAGAGAATACGAAACTCG
GCGTATTGACGTGGCTTTCCCGGTTTTGTCATGGCAAATGCGGGGAGGATGGTGCG
ATACAGGGTCTGTTTGAATTGTCTGGTATCCCCCTATGTAGGCTGCGATATTCAAA
GCTCCGCAGCTTGCATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAAATGCGGG
CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAATGATTGAAAAAGGTGACAAACCGGAGGCGAGG
ACGCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCACGGTCAGGTTTCGTCCTTTGGCG
TAACCAAAGTAAACAGTACGGAAGAACTAAACGCTGCGATAGAAGCAGCAGGACA
ATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCCGGGCTGTGAGGTGCGCTGC
GCGGTCATGGGAAACGAGGATGATTTGATTGTGCGCGAAGTGATCAAATCCGGT
TGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAAAACGAGCCGGAAAAAGGCTCAGA
GAATGCGATGATTATCGTTCCAGCAGACATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTG
CAAGAAACGGCAAAGAAAGTATATCGGGTGCTTGGATGCAGAGGGCTTGCTCGTG
TTGATCTTTTTTTTGCAGGAGGATGGCGGCATCGTTCTAAACGAGGTCCAATACCC
TGCCCCGTTTTTACATCGTACAGCCGCTATCCACGCATGGCGGCTGCCGCAGGAAT
CACGCTTCCCGCACTAATTGACAGCCTGATTACATTGGCGATAGAGAGGTGACCC
GTATGGAAAATGGTTTTTTTGTTTTTTAGATGAAATGTTGCA

De manière générale l'invention a également pour objet un fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il est capable d'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence telle que définie dans l'enchaînement II ci-dessus.

Les conditions stringentes sont les suivantes :

- * température de la réaction 65°C pendant une nuit dans une solution contenant 0,1% de SDS, 0,7% de lait en poudre écrémé, 6xSSC (1xSSC=0,15M NaCl et 0,015M de citrate de sodium à pH=7,0)
- * lavages à température ambiante dans 2xSSC-0,1% SDS puis à 65°C dans 0,2SSC-0,1% SDS.

Avantageusement un fragment nucléotidique répondant à la définition précédente aura au moins 15 nucléotides, de préférence au moins 20.

Une séquence nucléotidique particulière comprend à cet égard l'enchaînement suivant:

```
TCTGTTTGAATTGTCTGGTATCCCCTATGTAGGCTGCGATATTCAAA
GCTCCGCAGCTTGCATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAATGCGGG
CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAATGATTGAAAAAGGTGACAAACCGGAGGCGAGG
ACGCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCACGGTCAGGTTCTCTTTTGGCG
TAACCAAAGTAAACAGTACGGAAGAACTAAACGCTGCGATAGAAGCAGCAGGACA
ATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCTGGGCTGTGAGGTCTGGCTGC
GCGGTCATGGGAAACGAGGATGATTTGATTGTCTGGCGAAGTGGATCAAATCCGGT
TGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAAAACGAGCCGGAAAAAGGCTCAGA
GAATGCGATGATTATCGTTCCAGCAGACATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTG
CAAGAAACGGCAAAGAAAGTATATCGGGTGCTTGGATGCAGAGGGCTTGCTCGTG
TTGATCTTTTTTTTGCAGGAGGATGGCGGCATCGTTCTAAACGAGGTC
```

Les peptides et polypeptides de l'invention permettent de définir une classe génotypique, caractérisée par la capacité des séquences nucléotidiques codant pour ces peptides, d'hybrider dans des conditions stringentes avec la séquence II constituant une sonde.

Ces fragments peuvent être mis en oeuvre en tant qu'amorces pour la réalisation de réactions d'amplification, ou en tant que sondes.

Des amorces particulièrement intéressantes répondent aux séquences suivantes :

- amorce 1 : 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3' (positions 241-258 des nucléotides de la séquence I)
- amorce 2 : 5' GATTTCGTTCTCGACC 3' (séquence réverse-complémentaire du fragment des nucléotides 860 à 877 de la séquence I).

Des sondes nucléotidiques selon l'invention peuvent être spécifiques pour détecter chez des bactéries à Gram-positif des séquences codant pour une protéine VanB impliquée dans la résistance à des glycopeptides notamment à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, cette résistance étant inductible conformément à la définition précédente, ces sondes pouvant en outre être universelles parmi ces séquences.

Par les sondes spécifiques de vanB, on entend tout oligonucléotide hybridant avec une séquence nucléotidique codant pour une protéine VanB selon l'invention, telle que décrite dans les pages précédentes, et ne présentant pas de réaction d'hybridation croisée ou d'amplification (PCR) avec des séquences présentes chez l'ensemble des souches sensibles.

Un fragment nucléotidique particulier selon l'invention est caractérisé en ce qu'il n'hybride pas dans des conditions stringentes avec l'ADN de souches d'entérocoques sensibles à la vancomycine, en particulier avec l'ADN des souches E. faecalis JH2-2 et E. faecium BM4107.

Ces souches de référence ont respectivement été décrites par Jacobs et Hobbs (J. Bacteriol. 117, 1974, 360-372) et Leclercq et al (Antimicrob. Agents Chemother 33, 1989).

Un autre fragment nucléotidique intéressant dans le cadre de l'invention, est spécifique du gène vanB, dans la mesure où il n'hybride pas dans des conditions stringentes avec les gènes vanA et vanC tels que décrits dans la demande PCT 91920753.

Un fragment nucléotidique particulièrement intéressant dans le cadre de l'invention, est le fragment répondant à la séquence II.

Ce fragment est un fragment interne issu du gène impliqué dans la résistance à des souches d'entérocoques. La résistance peut exister à des niveaux variables de concentration en glycopeptides.

L'invention concerne aussi des fragments de nucléotides modifiés par rapport aux précédents, par mutation, addition ou délétion de nucléotides, dès lors que le fragment ainsi modifié soit code pour un fragment de la protéine VanB fonctionnel s'agissant de son association à la résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, dans les conditions décrites ci-dessus, soit hybride avec le gène vanB.

Dans l'hypothèse d'une utilisation des fragments nucléotidiques à titre de sondes, un marquage sera effectué, par les techniques classiques. A titre d'exemple, on utilisera des marqueurs radioactifs ou enzymatiques.

Des fragments de nucléotides selon l'invention peuvent être mis en oeuvre en tant qu'amorces, pour réaliser l'amplification, par exemple par PCR, d'acide nucléique contenu dans un échantillon biologique donné.

L'invention vise par ailleurs une séquence d'ADN recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides ci-dessus décrite, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans le clonage ou l'expression, d'un gène impliqué dans une résistance de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine, à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine, chez un hôte déterminé.

Ce gène impliqué dans la résistance est par exemple le gène vanB qui comprend la séquence de nucléotides II ou toute partie fonctionnelle en terme de résistance inductible, issue d'une séquence hybridant avec la séquence II.

L'invention concerne aussi un vecteur recombinant pour le clonage ou l'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique ci-dessus décrite en un site non essentiel pour sa réplication, le cas échéant sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression d'une résistance de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine, à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine, chez un hôte déterminé.

Des vecteurs particuliers sont par exemple des plasmides, des phages, des cosmides, des YAC.

Un vecteur préféré est le plasmide pAT201, déposé à la C.N.C.M. le 11 Décembre 1992 sous le numéro I-1277.

Un autre vecteur préféré est le plasmide pAT202 formé à partir du plasmide pUC190 contenant un fragment de 3,3 kb contenant le gène vanB de Enterococcus faecalis V583 (HindIII/KpnI).

pAT202 a été introduit dans E. coli JM83 et déposé à la CNCM le 29 Mars 1993, sous le n° I-1291 (identification E. coli BM2973).

Ces vecteurs peuvent être utilisés pour transformer ou transfecter des hôtes cellulaires afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques de l'invention.

Un hôte cellulaire recombinant selon l'invention est caractérisé en ce qu'il est modifié par une séquence nucléotidique ou un vecteur ci-dessus décrits.

De préférence l'hôte cellulaire est modifié par cette séquence dans des conditions permettant l'expression d'une protéine VanB fonctionnelle s'agissant de la résistance inductible à des glycopeptides.

L'invention a aussi pour objet une protéine VanB recombinante telle qu'obtenue à partir d'un hôte cellulaire recombinant selon la définition précédente, la protéine VanB obtenue étant caractérisée en ce que son ossature peptidique comprend la séquence d'acides aminés ci-dessus, et en ce qu'elle est impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

La protéine VanB selon l'invention permet de préparer des anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement la protéine VanB ou un fragment peptidique décrit ci-dessus.

Ces anticorps peuvent être obtenus selon les méthodes classiques de production d'anticorps. En particulier pour la préparation des anticorps monoclonaux on aura recours à la méthode de Kohler et Milstein selon laquelle on prépare des anticorps monoclonaux par fusion cellulaire entre des cellules de myélome et des cellules spléniques de souris préalablement immunisées avec un polypeptide ou une composition selon l'invention, conformément au procédé classique.

Les anticorps de l'invention sont avantageusement utilisables pour la détection de la présence de protéines caractéristiques d'une résistance aux glycopeptides, en particulier à la vancomycine et à la teicoplanine, cette résistance étant du type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

Entre également dans le cadre de l'invention, un kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique, de la présence de souches résistantes à des

glycopeptides après induction notamment par la vancomycine et non par la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit des souches d'entérocoques, par exemple E. faecium, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps ci-dessus décrits, le cas échéant marqués,
- un réactif pour la détection d'une réaction immunologique du type anticorps-antigène,
- le cas échéant des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé,
- le cas échéant une concentration déterminée de vancomycine, pour induire la résistance.

L'invention concerne aussi un kit tel que défini ci-dessus, qui comprend en outre des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine VanA et/ou des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine VanC.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le kit permet indifféremment la détection d'une résistance correspondant à un phénotype VanA, VanB ou VanC, et comprend des anticorps reconnaissant VanA, VanB et VanC. Ces anticorps peuvent être sélectionnés par leur capacité à reconnaître un épitope commun aux trois protéines. Il peut également s'agir d'un mélange d'anticorps reconnaissant des épitopes différents, propres à chacune des protéines.

Selon une autre mode de réalisation de l'invention, un kit pour le diagnostic in vitro de la présence de souches résistantes à bas niveau, à des glycopeptides, en particulier résistantes à la vancomycine, est caractérisé en ce qu'il comprend :

- une sonde nucléotidique capable d'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence nucléotidique du gène vanB, et le cas échéant,
- des nucléoside-triphosphates dATP, dCTP, dTTP, dGTP,
- un agent de polymérisation d'ADN.

Un autre kit de détection comprend en outre une sonde de nucléotides capable d'hybrider spécifiquement avec le gène vanA et une sonde capable d'hybrider spécifiquement avec le gène vanC.

Ce kit peut être avantageusement utilisé pour la détection d'une résistance chez des cocci à Gram-positif notamment chez des entérocoques, par exemple chez E. faecium.

L'invention vise aussi un kit pour la détection in vitro d'une résistance à des glycoprotéines, notamment à la vancomycine, cette résistance correspondant à l'un des phénotypes VanA, VanB ou VanC, le kit comprenant

- une sonde nucléotidique hybridant avec les gènes vanA, vanB et vanC,
- des nucléoside-triphosphates dATP, dCTP, dTTP et dGTP,
- un agent de polymérisation d'ADN.

L'invention vise aussi un procédé de détection in vitro de la présence de souches résistantes à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier à la famille des cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E. faecalis, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir les souches résistantes, avec une amorce constituée par un fragment nucléotidique selon l'invention, tel que décrit

ci-dessus, capable d'hybrider avec une séquence nucléotidique recherchée, impliquée dans l'expression de la résistance, cette séquence étant utilisée comme matrice, en présence des 4 différents nucléosides triphosphates, et d'un agent de polymérisation, dans des conditions d'hybridation telles que pour chaque séquence nucléotidique ayant hybridé avec une amorce, un produit d'élongation de chaque amorce complémentaire de la matrice est synthétisé,

- b) la séparation de la matrice et du produit d'élongation obtenu, ce dernier pouvant alors également se comporter comme une matrice,
- c) la répétition de l'étape a) de façon à obtenir une quantité détectable des séquences nucléotidiques recherchées,
- d) la détection du produit d'amplification des séquences nucléotidiques.

La sonde utilisée peut donc être spécifique de la séquence nucléotidique II ou d'une séquence hybridant dans des conditions stringentes avec la séquence II. Dans ces conditions, le procédé selon l'invention permet la détection d'une résistance à des glycopeptides, cette résistance étant inducible par la vancomycine et non inducible par la teicoplanine.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, ce procédé comprend également la mise en contact de l'échantillon biologique avec un fragment nucléotidique spécifique du gène *vanA* et/ou un fragment nucléotidique spécifique du gène *vanC*. Dans ce cas le procédé selon l'invention permet avantageusement la détection de différents phénotypes de résistance.

Selon un autre mode de réalisation, on détectera indifféremment une résistance correspondant à un phénotype *VanA*, *VanB* ou *VanC*, en utilisant une sonde

commune aux gènes vanA, vanB ou vanC. Une telle sonde peut être réalisée à partir des séquences polypeptidiques alignées de la figure 2.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et les figures suivants :

FIGURES

Figure 1 :

Séquence de nucléotides et d'acides aminés correspondant au gène vanB. La séquence de nucléotides des deux brins a été déterminée à partir de l'insérat contenu dans pUC18, par la méthode didéoxy de terminaison de chaîne (Sanger et al, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) en utilisant l'ADN polymérase T7.

La séquence soulignée RBS représente la séquence Shine-Dalgarno de liaison au ribosome.

Figure 2 :

Alignement de la séquence d'acides aminés déduite de la protéine VanB et des régions correspondantes de VanA, VanC, DdLA et DdLB de E.coli (Dutka-Malen et al, 1992 Gene, 112:53-58), Ddl de En.faecalis V583 et DdLA de S.typhimurium (Daub et al - Biochemistry 27, 1988, 3701-3708). Les acides aminés identiques (I) et les substitutions conservatives (C) dans les 7 séquences ont été indiqués sous l'alignement. Pour que la classification en tant que substitution soit conservée, les acides aminés ont été regroupés comme suit : RK, LFPMVI, STQNC, AGW, H, ED et Y.

Les domaines 1, 2, 3 et 4 correspondent à des régions de forte homologie.

Figure 3 :

Oligonucléotides V1 et V2 utilisés pour amplifier l'ADN du gène vanB.

Figure 4 :

Séquence de nucléotides du gène ddl de En.faecalis V583 et séquence d'acides aminés correspondante. Le plasmide pAT203 a été construit en sous-clonant l'ADN d'un bactériophage λ recombinant partiellement digéré avec Sau3AI (Pharmacia), dans pUC19 digéré avec BamHI (Pharmacia). L'insérat de 15 kb de pAT203 comprend le gène ddl. La séquence de nucléotides de 1079 pb consécutives de pAT203 a été déterminée sur les deux brins par la méthode dideoxy de terminaison de chaîne. La première paire de bases de la séquence est définie à la position 1. La séquence de liaison au ribosome RBS est à la position 19 en amont du codon de départ TTG. Le codon stop TTA est indiqué. La séquence d'acides aminés déduite de la protéine Ddl est présentée.

APPROCHE EXPERIMENTALE

Les antibiotiques de la famille des glycopeptides, tels que la vancomycine (Vm) et la teicoplanine (Te) se fixent aux résidus D-Ala C-terminaux des précurseurs du peptidoglycane, bloquant ainsi leur incorporation dans la paroi cellulaire bactérienne (Reynolds, P.E. 1989 Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8:943-950). Les résidus D-Ala sont incorporés dans les précurseurs au niveau de la paroi cellulaire, sous forme de dipeptides

synthétisés par des ligases D-Ala:D-Ala (DDL) (Walsh, C.T. 1989 J. Biol. Chem. 264:2393-2396). La ligase VanA synthétise le dipeptide D-Ala-D-lac qui se substitue à D-Ala-D-Ala conduisant à la synthèse de précurseurs qui lient la vancomycine avec une affinité réduite (Bugg et al, Biochemistry 30:10408-10415 (1991), Handwerger et al, J. Bacteriol. 174:5982-5984 (1992), Messer et Reynolds, FEMS Microbiol. Letters 94:195-200 (1992)).

La résistance aux glycopeptides chez les entérocoques est hétérogène (Dutka-Malen et al, 1990 Antimicrobiol Agents Chemother 34:1875-1879).

Les protéines de résistance VanA et VanC (voir demande de brevet EP 91920753.0 du 29 octobre 1991) montrent une homologie de 30 à 37% (les détails sont donnés dans le tableau III) en acides aminés avec les D-Ala:D-Ala ligases (Ala=Alanine) de E.coli (Dutka-Malen et al, 1992 Gene 112:53-58). Les gènes de structure pour les protéines VanA et VanC n'hybrident pas avec l'ADN des souches de phénotype VanB (Dutka-Malen et al, 1990, Leclercq et al, Antimicrob. Agents Chemother 36:2005-2008 (1992)).

Les inventeurs sont parvenus à identifier la séquence nucléotidique impliquée dans les propriétés de résistance à la vancomycine de souches d'entérocoques ayant le phénotype VanB et résistant, après induction avec la vancomycine.

Souches Bactériennes : 39 isolats de E.faecium (28 souches) et E.faecalis (11 souches) résistantes à de faibles ou de fortes concentrations de vancomycine et sensibles à la teicoplanine ont été étudiées (tableau II). Parmi ces souches, 24 isolats y compris E.faecalis V583 (Sahm D. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1989, 33:1588-91) et E.faecium D366 (Gutmann L. et al, Antimicrob. Agents Chemother 1992, 36:77-80) étaient résistantes à de faibles concentrations de vancomycine

sur la base d'un test de sensibilité sur disque. Ces souches appartiennent au phénotype de classe B. 15 isolats résistant à de fortes concentrations de vancomycine (CIM \geq 128 $\mu\text{g/ml}$) y compris E.faecalis souche V583-2 (Zarlenga LJ. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:902-5), qui est un mutant spontané de V553, ainsi que UMH-1 (Schwalbe R. et al, Abstract A-117, in Abstracts of the 91st General Meeting of the American Society for Microbiology. Dallas, TX: American Society for Microbiology, 1991) ont aussi été étudiés. Les souches-contrôle étaient des souches d'enterocoque bien caractérisées appartenant aux phénotypes A et C et hybridant avec les sondes VanA et VanC respectivement. Il s'agit en particulier de 6 isolats cliniques de E.faecium hautement résistants à la vancomycine et à la teicoplanine, incluant BM4147. Les souches de E.gallinarum incluant BM4174 appartenant à la classe C ont également été utilisées comme contrôle. Font également partie les contrôles de souches de E.casseliflavus, y compris la souche ATCC 25788, qui sont des isolats intrinsèquement résistants à de faibles niveaux de vancomycine et sensibles à la teicoplanine (Leclercq R. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:2005-8).

Les souches suivantes ont également été étudiées : Erysipelothrix rhusiopathiae A 124 (Institut Pasteur Collection), Lactobacillus brevis ATCC 14869, Lactobacillus casei ATCC 393, Lactobacillus confusus ATCC 10881, Lactobacillus fermentum ATCC 9338, Lactobacillus plantarum ATCC 8014, Lactobacillus reuteri ATCC 23272, Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469, Lactobacillus salivarius ATCC 11741, Pediococcus acidilacti ATCC 8042, Pediococcus pentosaceus ATCC 33316, et Leuconostoc mesenteroides CIP 16407. Les enterocoques suivants sensibles à des antibiotiques de

la famille des glycopeptides sont utilisés comme contrôles négatifs: E.durans ATCC 19432, E.faecium ATCC 19434, BM4107 (Leclercq R. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:2005-8), et MT10R (Gutmann L et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:77-80), souche sensible à la vancomycine dérivée de D366 ; E.faecalis ATCC 29212, ATCC 33186, JH2-2 (Leclercq R. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:2005-8), et V583-C1, souche sensible à la vancomycine dérivée de V583, (Tableau II), et un isolat clinique de E.faecium et E.faecalis. Des caractéristiques de souches de référence sont dépeintes au tableau I. E.faecium BM4107 et E.faecalis JH2-2, à la fois résistantes à la rifampine et à l'acide fusidique (Leclercq R. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1992, 36:2005-8), étaient utilisés comme souches réceptrices pour des expériences de conjugaison.

Identification des entérocoques

Les entérocoques ont été identifiés par la méthode de Facklam et Collins, J. Clin. Microbiol. 1989, 27:731-4). L'identification des espèces était fondée sur les tests de réduction du tellurite de potassium et de production d'acides à partir de carbohydrates sur des bandes de streptocoques API 20 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Le test de mobilité à 30°C et de fermentation des carbohydrates ont été utilisés pour distinguer E.gallinarum et E.casseliflavus de E.faecium et E.faecalis. Les souches de E.casseliflavus ont été distinguées des souches de E.gallinarum sur la base de la production d'un pigment jaune sur de l'agar.

Milieu

Un milieu coeur-cerveau et de l'agar (Difco Laboratoires, Détroit, MI) ont été utilisés. Des tests de sensibilité ont été réalisés sur de l'agar Mueller-Hinton (Diagnostics Pasteur, Marne La Coquette, France). Toutes les incubations ont été réalisées à 37°C.

Détermination de la sensibilité in vitro aux antibiotiques.

Le test de diffusion sur disque avec des disques contenant 30 µg de vancomycine ou 30 µg de teicoplanine (Diagnostics Pasteur) a été utilisé pour le criblage initial. La méthode de Steers et al avec 10⁴ CFU par tâche a été utilisée pour déterminer la CMI des antibiotiques (Steers E. et al, Antibiot. Chemother. (Basel) 1959, 9:307-11).

Transfert du caractère de résistance d'un antibiotique

La conjugaison sur filtres a été réalisée selon la technique décrite par Dutka-Malen S. et al, Antimicrob. Agents Chemother. 1990, 34:1875-9. Les concentrations en antibiotiques pour la sélection des transconjugués étaient les suivantes : rifampine : 20 µg/ml ; acide fusidique : 10µg/ml et vancomycine : 4 et 8 µg/ml.

Enzymes et réactifs

La lysozyme a été obtenue chez Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). La RNase A (pancréas de bovin) et la protéinase K ont été obtenues chez Calbiochem. Co. (San Diego, CA). L'[α-³²P]dCTP et le sel de triéthylammonium (activité spécifique 3000 CI/mmol) ont été obtenus de Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne. La teicoplanine provient de Gruppo Lepetit (Milan, Italie)

et la vancomycine provient de Eli Lilly & Co (Indianapolis, IN).

Les oligonucléotides V1 et V2 décrits dans la demande de brevet EP 91920753.0, ont permis l'amplification par la technique de PCR, de fragments internes aux gènes codant pour les protéines VanA, VanC et D-Ala:D-Ala ligases (Dutka-Malen et al, 1992 Gene 112:53-58).

L'amplification du gène vanB a été réalisée avec les oligonucléotides V1 et V2 et l'ADN (20 ng) de Enterococcus faecalis V583 (Sahm et al, 1989 Antimicrob. Agents Chemother 33:1588-1591) .

Pour réaliser cette amplification, la technique décrite dans la publication de Dutka-Malen et al, 1992 a été utilisée. Les fragments obtenus ont été séparés sur gel d'agarose (1%) dans un tampon TAE, qui a permis de révéler une bande unique d'environ 600 pb, qui a été extraite du gel en utilisant un kit de purification de l'ADN (GeneClean, Bio101 Inc., la Jolla, CA). En utilisant un kit permettant l'obtention d'extrémités franches au niveau de l'ADN (Amersham, Amersham, Grande-Bretagne), les fragments ont été traités avec l'ADN T4 polymérase et ligaturés au niveau du site SmaI d'un plasmide pUC18 digéré et déphosphorilé (Norrander et al, 1983, Gene 26:101-106).

La séquence de 632 pb (sonde vanB) correspondant à l'insert du plasmide recombinant (figure 1) a été déterminée par la méthode d'ideoxy de terminaison de chaîne (Sanger et al, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74:5463-5467) en utilisant l'ADN T7 polymérase (Pharmacia, Uppsala, Suède) et le [α -³⁵S]dATP (Amersham, Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne).

Etant donné que l'amplification avec l'ADN Taq polymérase peut conduire à des incorporations erronées de nucléotides, la séquence a été confirmée comme suit : un oligonucléotide complémentaire des positions 513 à 530 de la séquence nucléotidique de la figure 1 a été synthétisé par la méthode au phosphoramidite (unité de Chimie Organique, Institut Pasteur, France) et utilisé avec l'amorce V1 pour réaliser une amplification par PCR d'un fragment de vanB. Le produit PCR a été séquencé directement (Mabilat et al, 1990, Plasmid 23:27-34) ou après le clonage dans un vecteur pUC18, afin de révéler l'identité des nucléotides avec le fragment cloné obtenu avec V1 et V2.

Une hybridation de type southern a été réalisée selon la méthode de Johnson et al, Gene Anal. Technol. 1:3-8 (1984). L'ADN total des souches d'entérocoque (Tableau 1) a été préparé selon la technique décrite par Le Bouguénec et al, 1990, J. Bacteriol. 172:727-734, digéré avec les enzymes HindIII et KpnI (United States, Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) et résolu sur des gels d'agarose 1%. L'ADN a été transféré sur des membranes de nylon (Nytran, Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) avec un appareil de transfert sous vide (Trans. Vac. TE80, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA). La sonde a été obtenue en marquant le fragment PCR cloné avec un kit de translation de césure (Bethesda Research Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) et (α -³²P)dCTP (Amersham, Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne). L'hybridation a été réalisée dans des conditions stringentes à 68°C (Johnson et al, 1984, Gene Anal. Technol. 1:3-8). Les membranes ont été lavées à 65°C dans 0,1% SDS-2XSSC.

La sonde vanA consistait en un fragment PstI de 265 pb interne au gène vanA (Dukta Malen S. et al, Mol.

Gen. Genet. 1990, 224:364-72). La sonde vanC consistait en un fragment EcoRI-HincII de 690 pb, interne au gène vanC (Leclercq R. et al, Antimicrob. Agents Chemother 1992, 36:2005-8. Dukta Malen S. et al Gene, 1992, 112:53-8). La sonde vanB correspond à la séquence II.

La séquence en acides aminés déduite de l'insérat contenu dans le plasmide pUC18 a été comparée avec différentes séquences de protéines [figure 2] : le tableau 5 résume les pourcentages d'identité en acides aminés comparés deux à deux pour les séquences des protéines VanB, VanA, VanC, ElDdl, DdlA et DdlB. Dans les conditions d'hybridation en southern, le fragment cloné hybridait avec le fragment de 3,3 kb HindIII-KpnI de E. faecalis V583. La sonde n'hybride pas avec l'ADN d'un dérivé de V583 sensible à la vancomycine ou à l'ADN des souches de E. faecalis et E. faecium sensibles à la vancomycine utilisées comme référence. Le fragment d'ADN cloné obtenu par PCR correspond à un fragment interne du gène impliqué dans la résistance. Ce gène code pour une enzyme apparentée aux D-Ala:D-Ala ligases, appelée VanB, qui pourrait être impliquée dans la synthèse d'un produit se substituant à D-Ala-D-Ala.

Ces tests ont permis de mettre en évidence un seul groupe de gènes apparentés à vanB, et responsable d'un bas et d'un haut niveau de résistance à la vancomycine chez les entérocoques (tableaux 1 et 2).

Aucune hybridation n'a été observée entre la sonde VanB et l'ADN de souches sensibles à la vancomycine sans induction ou portant les gènes vanA ou vanC ou intrinsèquement résistantes.

La séquence complète du gène vanB a été clonée en mettant en oeuvre les étapes suivantes :

Le plasmide pAT202 a été obtenu en sous-clonant dans pUC19 un fragment HindIII-KpnI de 3,3 kb du

bactériophage recombinant λ contenant le gène vanB. Le clonage a été réalisé avec des endonucléases de restriction (Boehringer, Mannheim, Allemagne et Pharmacia LKB Biotechnology Inc. Uppsala, Suède), la T4 DNA ligase (Boehringer) et la phosphatase alcaline (Pharmacia) conformément aux recommandations du fabricant. La séquence nucléotidique de 1090 pb consécutives de pAT202 a été déterminée pour les deux brins par la méthode dideoxy de terminaison de chaîne (Sanger et al, 1977) en utilisant la T7 DNA polymérase modifiée (Amersham Radiochemical Center, Amersham, Grande-Bretagne) et des oligonucléotides complémentaires de la séquence, synthétisés par la méthode au méthoxy phosphoramidite (Institut Pasteur, Paris, France). Les produits des réactions ont été résolus par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 6% dénaturant. La première paire de bases de la séquence présentée correspond à la position 1 (figure 1). Le site potentiel de liaison au ribosome (RBS) (Moran et al, Mol. Gen. Genet. 186 (1982) 339-346) en amont du codon ATG d'initiation à la position 46 est souligné. Le codon stop (TGA) est indiqué par une astérisque. La séquence d'acides aminés est alignée avec le premier nucléotide de chaque codon.

Le transfert du caractère de résistance à la vancomycine (chez 6 isolats d'entérocoques parmi 17) par conjugaison sur filtre, a été observé chez des souches E.faecium et E.faecalis résistantes à de faibles ou à de fortes concentrations d'antibiotiques.

Parmi les autres fragments d'environ 600 bp amplifiés à partir des oligonucléotides V1 et V2, un insérat hybridait avec l'ADN de souches Vm^R ou Vm^S de En.faecalis mais pas avec l'ADN de souches de 18 autres espèces. Ce gène code pour une D-Ala:D-Ala ligase dans

En.faecalis. Puisqu'aucun autre gène de ligase dans En.faecalis n'a été détecté, ce gène a été appelé ddl.

Le clonage et le séquençage du gène ddl inséré dans le vecteur pUC19 (Norrande et al, Gene 26, 1983, 101-106) ont permis de constater que la teneur en bases G et C de ddl (37,5%) et du chromosome de En.faecalis (37-39%) étaient très semblables.

Différentes observations suggèrent que le gène vanB aurait une origine exogène : (i) le gène peut être transféré par conjugaison. (ii) Les séquences de nucléotides apparentées à van B n'ont pas été détectées dans l'ADN de souches Vm^S de En.faecalis et En.faecium et les représentants de 16 autres espèces d'Enterococcus (tableau III). (iii) La teneur en bases GC du gène vanB diffère de façon marquée de celle du chromosome de En.faecalis. (iv) Le niveau faible de similitude entre Ddl de En.faecalis et VanB (34% d'identité) indique que les gènes correspondants n'ont pas pour origine une duplication récente.

Précurseurs de peptidoglycanes chez En.faecalis Vm^R et Vm^S

L'incubation de En.faecalis V583 avant l'induction de souches En.faecalis JH2-2 Vm^R ou Vm^S (Jacob et Hobbs - J. Bacteriol. 117, 1974, 360-372) avec la ramoplanine (9 µg/ml) inhibiteur de la paroi cellulaire a conduit à l'accumulation du précurseur de la paroi cellulaire UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala (UDP-Mur-NAc-pentapeptide) qui est utilisé dans le cycle normal de la synthèse du peptidoglycane.

Après l'induction de la résistance, En.faecalis V583 a accumulé trois intermédiaires de la paroi cellulaire lorsque la souche était incubée avec la ramoplanine (tableau IV). Ces intermédiaires ont été

identifiés comme étant des UDP-MurNac-pentapeptides, UDP-MurNac-tetrapeptide dépourvu de la partie C-terminale D-Ala de l'UDP-MurNac-pentapeptide ; et de façon prédominante, UDP-MurNac-tetrapeptide-D-lactate dans lequel la partie C-terminale D-Ala de l'UDP-MurNac-pentapeptide est remplacée par le D-lactate. La présence de UDP-MurNac-tetrapeptide-D-lactate suggère que les souches de phénotypes VanA et VanB ont le même mécanisme de base de résistance aux glycopeptides ; c'est à dire qu'ils synthétisent du D-lactate qui peut être lié à VanB (ou VanA) par le D-Ala pour synthétiser du D-Ala-D-lactate qui est ensuite incorporé dans le précurseur de peptidoglycane.

Les précurseurs de la paroi ont été purifiés par chromatographie d'échange d'ions et désalage par filtration sur gel. L'identification a été fondée sur une spectroscopie de masse (positive ion electrospray mass spectroscopy), un spectre UV (pour l'uracil) analyse automatisée des acides aminés après hydrolyse pendant 4h et 24h (pour l'acide muramique et les taux en acides aminés) et l'analyse par réactions enzymatiques spécifiques du résidu terminal obtenu par réaction avec le D,D-carboxypeptidase de Actinomadura R39 (Messer et Reynolds, FEMS Microbiol Letter 94, 1992, 195-200).

La quantité totale de précurseurs accumulée dans chaque culture était semblable approximativement. 65 $\mu\text{mol/g}$ de poids sec dans une période d'incubation correspondant à 0,6 de la durée moyenne de synthèse.

TABLEAU I: Souches bactériennes

Souche	CMI ($\mu\text{g/ml}$) Vm	Te	Hybridation avec la sonde vanB			Référence
			vanA	vanB	vanC	
<i>E. faecalis</i>						
V583	64	0,5	-	+	-	Sahm et al (1989)
V583-C1	2	0,5	-	-	-	D.F. Sahm
V583-2	1024	1,0	-	+	-	Zarlenga LJ (1992)
UMH-1	1024	1,0	-	+	-	Schwalbe et al (1991)
ATCC 29212	2	0,5	-	-	-	
<i>E. faecium</i>						
D366	32	0,5	-	+	-	Gutmann et al (1992)
MT10R	2	0,25	-	-	-	Gutmann et al (1992)
BM4147	1024	512	+	-	-	Dutka-Malen et al (1990)
ATCC 19434	1	1	-	-	-	
<i>E. gallinarum</i>						
BM4174	8	1	-	-	+	Dutka-Malen et al (1992)
<i>E. casseliflavus</i>	8	1	-	-	-	

29

TABLEAU II:

**Classes de phénotypes et génotypes parmi les cocci à
Gram-positif, résistantes à la vancomycine**

CLASSE DE PHENOTYPE	CLASSE DE (A) GENOTYPE	ESPECE	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
			Vancomycine	Teicoplanine
Susceptible	Susceptible	Enterococcus spp.(10)	0.5-2	0.25
A	A	E.faecium(6)	256->1.000	64->1.000
B	B	E.faecium(28)	4-256	0.5-1
B	B	E.faecalis(11)	4-1024	0.5-1
C	C	E.gallinarum(3)	8	1
C	NC	E.casseliflavus(2)	4-8	0.5-1
NC	NC	Lactobacillus spp.(8)	>1.000	>1.000
NC	NC	Leuconostoc...sp.(1)	>1.000	>1.000
NC	NC	Pediococcus spp.(2)	>1.000	>1.000
NC	NC	E.rhusiopathiae(1)	>1.000	>1.000

(a) A: hybridation avec la sonde vanA ; B: hybridation avec la sonde vanB ;
C: hybridation avec la sonde vanC ; NC : non classé

TABLEAU III

Résultats des expériences d'hybridation

Espèces	Resistance phenotype	Nbre de souches testées	Hybridation avec sonde	
			<i>vanB</i>	<i>ddl</i> (<i>En. faecalis</i>)
<i>En. faecalis</i>	Vm ^R , Te ^S	11	+	+
	Vm ^S , Te ^S	5	-	+
<i>En. faecium</i>	Vm ^R , Te ^R	6	-	-
	Vm ^R , Te ^S	28	+	-
	Vm ^S , Te ^S	4	-	-
<i>En. gallinarum</i>	Vm ^R , Te ^S	3	-	-
<i>En. casseliflavus</i>	Vm ^R , Te ^S	2	-	-
<i>En. spp.</i> (15 espèces ^a)	Vm ^S , Te ^S	15	-	-

^a Type de souches de *En. avium*, *En. cecorum*, *En. columbae*, *En. dispar*, *En. durans*, *En. flavescens*, *En. hirae*, *En. malodoratus*, *En. mundtii*, *En. pseudoavium*, *En. raffinosus*, *En. saccharolyticus*, *En. seriolicida*, *En. solitarius* et *En. sulfureus*.

TABLEAU IV

Précurseurs de peptidoglycane dans des souches de *En. Faecalis* Vm^S ou Vm^R

Précurseur de Peptidoglycane	Quantité de précurseur (%) de <i>En. faecalis</i>	
	JH2-2	V583 non-induite V583 induite
UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala	100	100 14
UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala	0	0 7
UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactate	0	0 79

TABLEAU V

Identité de séquence entre les séquences d'acides aminés de Van
b, Ddl de *En.faecalis* V583 et des D-Ala:D-Ala ligases^a

Pourcentage d'identité par rapport à :					
Sequence comparée ^b	VanB	VanC	EfDdl	EcDdlA	StDdlA
VanA	76	38	32	38	37
VanB		38	34	38	38
VanC			34	34	34
EfDdl				40	40
EcDdlA					90
StDdlA					

^a Identité des paires de séquences dérivée de l'alignement de la figure 2

^b Ec, *E.coli*; Ef, *En.faecalis*; St, *S.typhimurium*

REVENDEICATIONS

1. Protéine VanB caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'acides aminés suivante I, et en ce qu'elle est impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

M N K I K V A I I F G G C S E E H D V S V K S A I E I A
 A N I N T E K F D P H Y I G I T K N G V W K L C K K P C
 T E W E A D S L P A I F S P D R K T H G L L V M K E R E
 Y E T R R I D V A F P V L H G K C G E D G A I Q G L F E
 L S G I P Y V G C D I Q S S A A C M D K S L A Y I L T K
 N A G I A V P E F Q M I E K G D K P E A R T L T Y P V F
 V K P A R S G S S F G V T K V N S T E E L N A A I E A A
 G Q Y D G K I L I E Q A I S G C E V G C A V M G N E D D
 L I V G E V D Q I R L S H G I F R I H Q E N E P E K G S
 E N A M I I V P A D I P V E E R N R V Q E T A K K V Y R
 V L G C R G L A R V D L F L Q E D G G I V L N E V N T L
 P G F T S Y S R Y P R M A A A A G I T L P A L I D S L I
 T L A I E R

2. Protéine VanB selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle a la capacité de conférer une résistance de type inductible à des glycopeptides et en particulier à la vancomycine, chez des entérocoques et par exemple chez des souches du genre E. faecium ou E. faecalis.

3. Protéine VanB selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence d'acides aminés modifiée par rapport à la séquence I, par délétion, insertion, ou remplacement d'un ou plusieurs acides aminés, dès lors que la protéine VanB ainsi modifiée est impliquée chez des

bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

4. Fragment peptidique de la protéine VanB caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence d'acides aminés I ou à toute partie de cette séquence fonctionnellement associée à la résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, chez des bactéries à Gram-positif, par exemple des bactéries de la famille des enterocoques, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

5. Fragment peptidique de la protéine VanB, caractérisé en ce qu'il correspond à la séquence d'acides aminés I ou à toute partie de cette séquence et en ce qu'il a des propriétés antigéniques.

6. Fragment peptidique de la protéine VanB selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est reconnu spécifiquement par des anticorps dirigés contre la protéine VanB, et qu'il est dépourvu de réaction immunologique avec des anticorps reconnaissant les protéines VanA et/ou VanC.

7. Séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine VanB impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine, ladite protéine VanB comprenant dans son ossature peptidique, la séquence d'acides aminés I, ou en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ADN complémentaire de cette séquence codante, ou d'une séquence d'ARN correspondante.

8. Séquence de nucléotides selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement

de nucléotides II suivant ou un enchaînement nucléotidique modifié par rapport à II, dès lors qu'il code pour une protéine impliquée chez des bactéries à Gram-positif, dans une résistance à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, cette résistance étant de type inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

GAGCGTGTGCTGCGAGATACCACAGAAAACAATCAGAATTGTCTTAACTTTGAAA
GGAGTTTACAGCATGAATAAAATAAAAGTCGCAATTATCTTCGGCGGTTGCTCGG
AGGAACATGATGTGTGCGGTAAAATCCGCAATAGAAATTGCTGCGAACATTAATAC
TGAAAAAATTCGATCCGCACTACATCGGAATTACAAAAAACGGCGTATGGAAGCTA
TGCAAGAAGCCATGTACGGAATGGGAAGCCGATAGTCTCCCCGCCATATTCTCCC
CGGATAGGAAAACGCATGGTCTGCTTGTCTATGAAAGAAAGAGAATACGAAACTCG
GCGTATTGACGTGGCTTTCCCGGTTTTGCATGGCAAATGCGGGGAGGATGGTGCG
ATACAGGGTCTGTTTGAATTGTCTGGTATCCCCTATGTAGGCTGCGATATTCAAA
GCTCCGCAGCTTGATGGACAAATCACTGGCCTACATTCTTACAAAAAATGCGGG
CATCGCCGTCCCCGAATTTCAAATGATTGAAAAAGGTGACAAACCGGAGGCGAGG
ACGCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCACGGTCAGGTTCTGTCCTTTGGCG
TAACCAAAGTAAACAGTACGGAAGAACTAAACGCTGCGATAGAAGCAGCAGGACA
ATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCCGGGCTGTGAGGTCCGGCTGC
GCGGTCTATGGGAAACGAGGATGATTTGATTGTGCGCGAAGTGGATCAAATCCGGT
TGAGCCACGGTATCTTCCGCATCCATCAGGAAAACGAGCCGGAAAAAGGCTCAGA
GAATGCGATGATTATCGTTCCAGCAGACATTCCGGTTCGAGGAACGAAATCCGGTG
CAAGAAACGGCAAAGAAAGTATATCGGGTGCTTGGATGCAGAGGGCTTGCTCGTG
TTGATCTTTTTTTTGCAGGAGGATGGCGGCATCGTTCTAAACGAGGTCCAATACCC
TGCCCGGTTTTTACATCGTACAGCCGCTATCCACGCATGGCGGCTGCCGCAGGAAT
CACGCTTCCCGCACTAATTGACAGCCTGATTACATTGGCGATAGAGAGGTGACCC
GTATGGAAAATGGTTTTTTTGTTTTTTAGATGAAATGTTGCA

9. Fragment nucléotidique caractérisé en ce qu'il est capable d'hybrider dans des conditions stringentes avec une séquence selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8 ou fragment nucléotidique complémentaire.

10. Fragment nucléotidique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il n'hybride pas dans des conditions stringentes avec l'ADN de souches d'enterocoques sensibles à la vancomycine, en particulier avec l'ADN des souches E. faecalis JH2-2, E. faecium BM4107.

11. Fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, caractérisé en ce qu'il répond à la séquence II.

12. Fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il est marqué.

13. Fragment nucléotidique selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il répond à l'une des séquences suivantes :

- amorce 1 : 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3'
- amorce 2 : 5' GATTTCGTTCTCGACC 3'.

14. Séquence d'ADN recombinante, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression, d'une résistance de type inductible, à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine, chez un hôte déterminé, cette résistance étant inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

15. Vecteur recombinant pour le clonage ou l'expression dans un hôte déterminé, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, en un site non essentiel pour sa répllication, sous le contrôle d'éléments de régulation susceptibles d'intervenir dans l'expression, d'une résistance de type inductible à des antibiotiques de la famille des glycopeptides, notamment la vancomycine, cette résistance étant

inductible par la vancomycine et non inductible par la teicoplanine.

16. Vecteur recombinant selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pAT201 déposé à la CNCM sous le numéro I-1277 ou du plasmide pAT202 déposé à la C.N.C.M. sous le numéro I-1291.

17. Hôte cellulaire recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 7 à 12 ou un vecteur selon la revendication 15 ou la revendication 16, cet hôte étant par exemple choisi parmi les bactéries, notamment les cocci à Gram-positif.

18. Anticorps monoclonaux ou polyclonaux caractérisés en ce qu'ils reconnaissent spécifiquement la protéine VanB selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 ou un fragment peptidique selon l'une quelconque des revendications 4 à 6.

19. Kit pour le diagnostic in vitro sur un échantillon biologique, de la présence de souches résistantes à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit des souches d'entérocoques, par exemple E. faecium, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des anticorps selon la revendication 18, le cas échéant marqués,
- un réactif pour la détection d'une réaction immunologique du type anticorps-antigène,
- le cas échéant des réactifs pour effectuer la lyse des cellules de l'échantillon testé,
- le cas échéant une concentration déterminée de vancomycine pour induire la résistance.

20. Kit selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine VanA t/ou des

anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine VanC.

21. Kit pour le diagnostic in vitro de la présence de souches résistantes à des glycopeptides, en particulier résistantes à la vancomycine, ces souches appartenant en particulier aux cocci à Gram-positif notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une sonde nucléotidique selon la revendication 12, et le cas échéant,
- des nucléoside-triphosphates dATP, dCTP, dTTP, dGTP,
- un agent de polymérisation d'ADN.

22. Kit selon la revendication 21 caractérisé en ce qu'il comprend en outre des sondes nucléotidiques spécifiques des gènes vanA et/ou vanC.

23. Procédé de détection in vitro de la présence de souches résistantes à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier à la famille des cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E. faecalis, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir les souches résistantes, avec une amorce constituée par un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10, capable d'hybrider avec une séquence nucléotidique recherchée, nécessaire à l'expression de la résistance, cette séquence étant utilisée comme matrice, en présence des 4 différents nucléosides triphosphates, et d'un agent de polymérisation, dans des conditions d'hybridation telles que pour chaque séquence

- nucléotidique ayant hybridé avec une amorce, un produit d'élongation de chaque amorce complémentaire de la matrice est synthétisé,
- b) la séparation de la matrice et du produit d'élongation obtenu, ce dernier pouvant alors également se comporter comme une matrice,
 - c) la répétition de l'étape a) de façon à obtenir une quantité détectable des séquences nucléotidiques recherchées,
 - d) la détection du produit d'amplification des séquences nucléotidiques.

24. Procédé de détection in vitro de souches résistantes à des glycopeptides, en particulier à la vancomycine et/ou à la teicoplanine, ces souches appartenant en particulier à la famille des cocci à Gram-positif, notamment en ce qu'il s'agit de souches d'entérocoques, par exemple E. faecium ou E. faecalis, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir les souches résistantes, avec une amorce constituée par un fragment nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 9 ou 10 et avec un fragment nucléotidique du gène *vanA* et un fragment nucléotidique spécifique du gène *vanC*, capable d'hybrider avec une séquence nucléotidique recherchée, nécessaire à l'expression de la résistance, cette séquence étant utilisée comme matrice, en présence des 4 différents nucléosides triphosphates, et d'un agent de polymérisation, dans des conditions d'hybridation telles que pour chaque séquence nucléotidique ayant hybridé avec une amorce, un produit d'élongation de chaque amorce complémentaire de la matrice est synthétisé,

- b) la séparation de la matrice et du produit d'élongation obtenu, ce dernier pouvant alors également se comporter comme une matrice,
- c) la répétition de l'étape a) de façon à obtenir une quantité détectable des séquences nucléotidiques recherchées,
- d) la détection du produit d'amplification des séquences nucléotidiques.

25. Procédé de criblage de molécules en particulier d'antibiotiques actifs pour le traitement des infections dues à des cocci à Gram-positif, en particulier des entérocoques, caractérisé en ce que l'on détecte l'activité de ces molécules, sur des bactéries ayant un phénotype de résistance notamment à la vancomycine, de type VanB.

1/6

RBS

GAGCGTGTGCTGCGAGATACCACAGAAAACAATCAGAATTGTCTTAACTTTGAAGGAGT 60

M N K I K V A I I F G G C S E E H D 18

TTACAGCATGAATAAAATAAAAGTCGCAATTATCTTCGGCGGTTGCTCGGAGGAACATGA 120

V S V K S A I E I A A N I N T E K F D P 38

TGTGTCGGTAAAATCCGCAATAGAAATTGCTGCGAACATTAATACTGAAAAATTTCGATCC 180

H Y I G I T K N G V W K L C K K P C T E 58

GCACTACATCGGAATTACAAAAACGGCGTATGGAAGCTATGCAAGAAGCCATGTACGGA 240

W E A D S L P A I F S P D R K T H G L L 78

ATGGGAAGCCGATAGTCTCCCCGCCATATTCTCCCCGGATAGGAAAACGCATGGTCTGCT 300

amorce 1

V M K E R E Y E T R R I D V A F P V L H 98

TGTCATGAAAGAAAGAGAATACGAAACTCGGCGTATTGACGTGGCTTTCCCGGTTTTGCA 360

G K C G E D G A I Q G L F E L S G I P Y 118

TGGCAAATGCGGGGAGGATGGTGCATACAGGGTCTGTTTGAATTGTCTGGTATCCCCTA 420

V G C D I Q S S A A C M D K S L A Y I L 138

TGTAGGCTGCGATATTCAAAGCTCCGCAGCTTGATGGACAAATCACTGGCCTACATTCT 480

T K N A G I A V P E F Q M I E K G D K P 158

TACAAAAATGCGGGCATCGCCGTCCCCGAATTTCAAATGATTGAAAAAGGTGACAAACC 540

E A R T L T Y P V F V K P A R S G S S F 178

GGAGGCGAGGACGCTTACCTACCCTGTCTTTGTGAAGCCGGCACGGTCAGGTTCGTCCTT 600

FIGURE 1A

2/6

```

G V T K V N S T E E L N A A I E A A G Q 198
TGGCGTAACCAAAGTAAACAGTACGGAAGAATAACGCTGCGATAGAAGCAGCAGGACA 660

Y D G K I L I E Q A I S G C E V G C A V 218
ATATGATGGAAAAATCTTAATTGAGCAAGCGATTTCTGGGCTGTGAGGTCGGCTGCGCGGT 720

M G N E D D L I V G E V D Q I R L S H G 238
CATGGGAAACGAGGATGATTTGATTGTCTGGCGAAGTGGATCAAATCCGGTTGAGCCACGG 780

I F R I H Q E N E P E K G S E N A M I I 258
TATCTTCCGCATCCATCAGGAAAACGAGCCGAAAAAGGCTCAGAGAATGCGATGATTAT 840

V P A D I P V E E R N R V Q E T A K K V 278
CGTTCCAGCAGACATTCCGGTCGAGGAACGAAATCGGGTGCAAGAAACGGCAAAGAAAGT 900
      amorce 2

Y R V L G C R G L A R V D L F L Q E D G 298
ATATCGGGTGCTTGGATGCAGAGGGCTTGCTCGTGTTGATCTTTTTTTCAGGAGGATGG 960

G I V L N E V N T L P G F T S Y S R Y P 318
CGGCATCGTTCTAAACGAGGTCAATACCTGCCCGGTTTACATCGTACAGCCGCTATCC 1020

R M A A A A G I T L P A L I D S L I T L 338
ACGCATGGCGGCTGCCGCAGGAATCAGCTTCCCGCACTAATTGACAGCCTGATTACATT 1080

A I E R * 342
GGCGATAGAGAGGTGACCCGTATGGAAAATGGTTTTTTGTTTTTTAGATGAAATGTTGCA 1140

```

amorce 1: 5' ATGGGAAGCCGATAGTC 3' pos. 241 - 258

amorce 2: 5' GATTTCTGTTCTCTCGACC 3' pos. 860 - 877 (réverse-complémentaire)

FIGURE 1B (SUITE DE FIGURE 1A)

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

VanA	MNRKIVAILF	GGCSEEHVDS	VKSAIEIAAN	INKEKYEPLY	IGITKSGVWK	MCEKPCAEME	NDNCYSAVLS	PDKKMHGLLV	KKNHEYEIN-	-----HVD	92
VanB	MNKIKVAILF	GGCSEEHVDS	VKSAIEIAAN	INTEKFDPHY	IGITKNGVWK	LCKKPCTEME	AD-SLPAIFS	PDRKTHGLLV	MKEREXETR-	-----RID	91
VanC	--MKTIAVLF	GGNSPEYSVS	LTSASVIOA	IDPLKYEVT	IGIAPTHDHY	WYQGNLANVR	NDTWLEDHKN	CHQLTFSSOG	FILGEKRI--	-----VPD	89
Efd1	---LKIIILY	GGRSEEHVDS	VLSAYSVLNA	IYYKYVQVQL	VFSKDGQVH	KGPLLSERPO	NKEVLHLTWA	QTPEETGEFS	GKRISPSEIY	E-----EEA	91
Ecdd1A	MEKLRVGIVF	GGKSAEHEVS	LQSAKNIVDA	IDKSREDDVL	LGIDKQGWV	VSDASNYLLN	ADDPAHIALR	PSATSLAQVP	GKHEHQLIDA	QNGQPLPTVD	100
Stdd1A	MAKLRVGIVF	GGKSAEHEVS	LQSAKNIVDA	IDKTREDVVL	LGIDKAGQWH	VNDASNYLQN	ADDPAHIALR	PSAISLAQVP	GKHQQLINA	QNGQPLPTVD	100
Ecdd1B	-MTDKIAVLL	GGTSAEREVS	LNSGAANVLG	LREGGIDAYP	VDPKEVDVTO	LKSM-----	-----	-----	-----	-----Gfq	56
	CC CCC II I I	II C IC C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	C C	
	domain 1										
VanA	VAFSALHGKS	GEDGSIQGLF	ELSGIPFVGC	DIQSSAICMD	KSLTYIVAKN	AGIATPAFW	INKODR-----	-----PVAAT	FTYPVFVKPA	MSGSSFGVKK	183
VanB	VAFPVLHGKC	GEDGAIQGLF	ELSGIPYVGC	DIQSSAACHD	KSLAYILTKN	AGIAVPEFOM	IEKGOK-----	-----PEART	LTYPVFVKPA	MSGSSFGVTK	182
VanC	VLPFVLHGKY	GEDGCIQGLL	ELMNLPHYGC	HVAASALCHN	KWLLHQLADT	MGIASAPTLT	LSRYENDPAT	ID----RFIQD	HGPFIFIKPN	EAGSSKGITK	186
Efd1	IVFPVLHGPN	GEDGSIQGFH	ETINMPYVGA	GVLASANAMD	KIMTKVLLQT	VGIQVPPFVP	VLRSDWKGNP	KEVTEKCEGS	LTYPVFVKPA	NMGSSVGISK	191
Ecdd1A	VIFPVIHGTLL	GEDGSLQGMH	RVANLPFVGS	DVLASAACHD	KDVAKRLLRD	AGLNIAPFIT	LTRANRHINIS	FA----EYESK	LGLPLFVKPA	NQGSSVGVS	197
Stdd1A	VIFPVIHGTLL	GEDGSLQGMH	RVANLPFVGS	DVLSSAACHD	KDVAKRLLRD	AGLNIAPFIT	LTRANRHAFS	FA----EYESR	LGLPLFVKPA	NQGSSVGVS	197
Ecdd1B	KVFIALHGRC	GEDGTLOQML	ELMGLPYTGS	GVMASALSND	KLRSKLLWQG	AGLPVAPWVA	LTRAEFKGL	SDKQLAEISA	LGLPVIVKPS	REGSSVGMSK	156
	I CII III CII CC	CI I C II I I	C C	C C	C C	C C	C C	ICCCII	III IC I		
	domain 2										

FIGURE 2A

VnaA	VNSADELDYA	IESARQYDSK	ILIEQAVSGC	EVGCAVLGNS	AALVVGVDQ	IRLQYGFRI	HQVEPEKGS	ENAVITVPAD	LSAEERGRIQ	ETAKKIYKAL	283
VanB	VNSTEELNAA	IEAAGQYDGK	ILIEQAISGC	EVGCAVMGNE	DDLIVGEVDO	IRLSHGIFRI	HQNEPEKGS	ENAMIIIVPAD	IPVEERNRVQ	ETAKKIVYRVL	282
VanC	VTDKTALQSA	LTTAFAYGST	VLIQKAIAGI	EIGCGILGNE	-QLTIGACDA	ISLVDGFDF	EERYQLIS--	--ATITVPAP	LPLALESQIK	EQAQLLYRNIL	281
Ecd1A	VENRDELQEA	LEAFRYDAR	AIIVEQGIAR	EIECAVLGNE	-DVRTILPGE	VYKDVAFYD	DAKYINNT--	--IEMQIPAH	VPEEVAHQAO	EYAKKAYIML	286
Ecdd1A	VTSEEQYIA	VDLAFEDHK	VIVEQGIKGR	EIECAVLGND	-NPQASTCGE	IVLTSDFYAY	DTKYIDEDG-	--AKVVVPAA	IAPENDKIR	AIAVQAYOTL	293
Stdd1A	VANEAQYQOA	VALAFEDHK	VVEQGIKGR	EIECAVLGND	-NPQASTCGE	IVLNSEFYAY	DTKYIDONG-	--AQVVVPAQ	IPSEVNDKIR	AIQAYOTL	293
Ecdd1B	VVAENALQDA	LRLAFQHDEE	VVLEKNLSCP	EFTVAILGEE	----ILPSIR	IQPSGTIFYD	EAKYLSDE--	--TQYFCPAG	LEASQEANLQ	ALVLKAWTTL	248
		I C I	CC CC C	IC CCCI		C C		II C		I	
		domain 3									
VnaA	GCRGLARVDM	FLQDNGRIVL	NEVNTLPGET	SYSRYPRMAA	AAGIALPELI	DRLIVLALKG	-----	-----	-----	-----	343
VanB	GCRGLARVDL	FLQEDGGIVL	NEVNTLPGET	SYSRYPRMAA	AAGITLPAI	DSLITLAIER	-----	-----	-----	-----	342
VanC	GLTGLARIDF	FVTNQGAIVL	NEINTMPGET	GHSRYPRMAA	EVGLSYEILV	EQLIALAEE	-----	-----	-----	-----	343
Ecd1A	DGSGLSRCD	FLTSKNELFL	NELNTPGET	PFSHYPLWE	NMGLKYSOLI	EELIOLALNR	-----	-----	-----	-----	348
Ecdd1A	GCAGMARVDV	FLTPENEVVI	NEINTLPGET	NISHYPKLMQ	ASGLGYTDLI	TRLIELALER	-----	-----	-----	-----	364
Stdd1A	GCAGMARVDV	FLTADNEVI	NEINTLPGET	NISHYPKLMQ	ASGLGYTDLI	SRLIELALER	-----	-----	-----	-----	364
Ecdd1B	GCKGMGRIDV	MLSDGQFYL	LEANTSPGMT	SHSLVPMAR	QAGMSFSQV	VRILELAD--	-----	-----	-----	-----	306
		I I IC CC	C C I I I I I I	I I I I I I	IC IC	CC II					
		domain 4									

FIGURE 2B (SUITE DE FIGURE 2A)

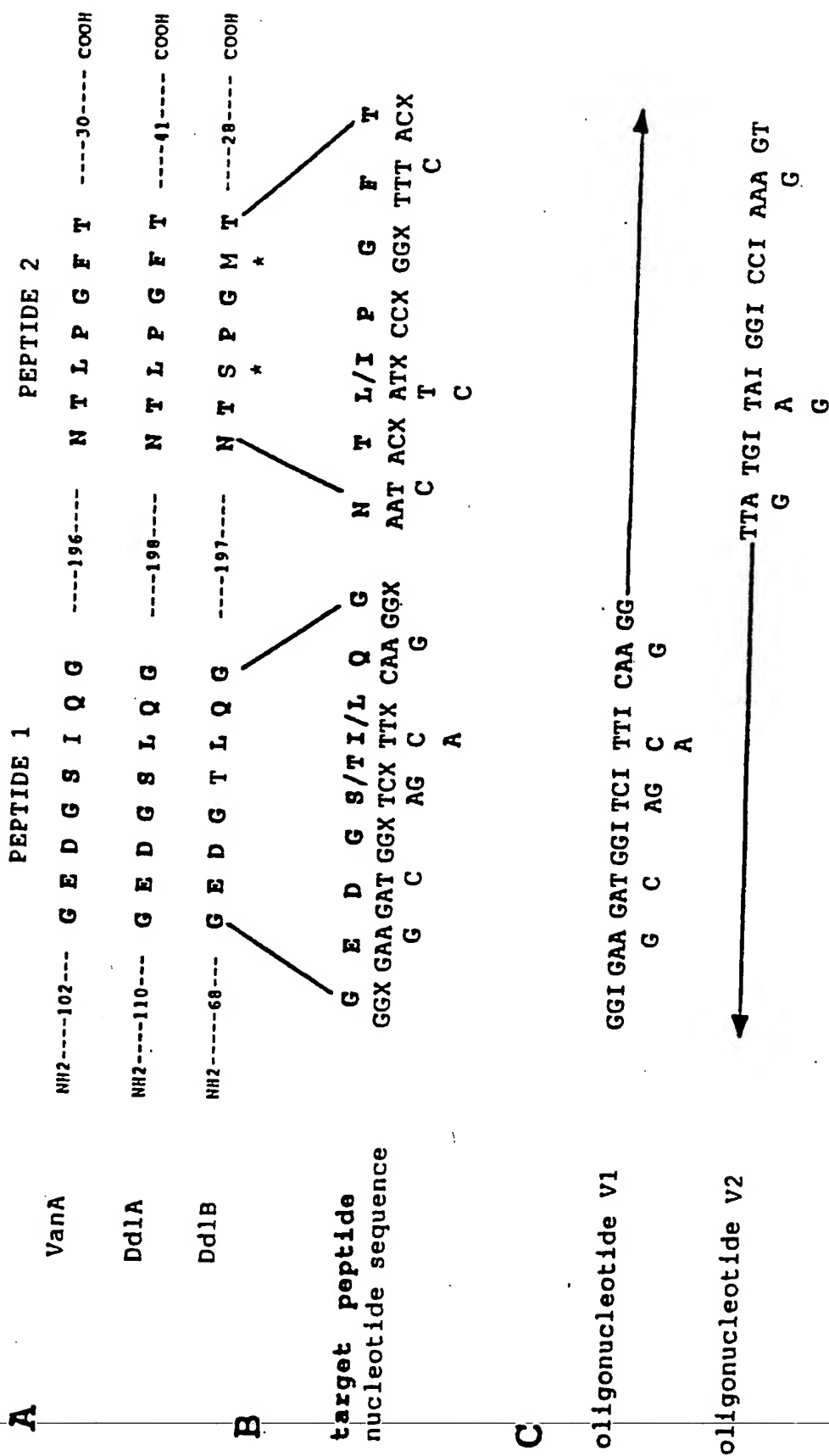


FIGURE 3

6/6

RBS	L K I I L L Y G G R	10
AAAGACAGGAAAGAACTAGGAGGACAAGCATTGGAAGATTATTTTGTGTATGGCGGCA		60
S E E H D V S V L S A Y S V L N A I Y Y		30
GAAGTGAAGAGCACGATGTGTCTGTTTGTCTGCATATCCGTTTTAAATGCAATCTATT		120
K Y Y Q V Q L V F I S K D G Q W V K G P		50
ATAAATATTATCAAGTACAGTTAGTCTTTATTAGTAAAGACGGTCAATGGGTAAAAGGCC		180
L L S E R P Q N K E V L H L T W A Q T P		70
CTCTTTTATCTGAACGACCACAAAATAAAGAAGTTTTACATTAACTTGGGCACAAACAC		240
E E T G E F S G K R I S P S E I Y E E E		90
CTGAAGAAACAGGCGAATTTTCAGGAAAACGAATCAGTCCTTCGGAAATTTATGAAGAAG		300
A I V F P V L H G P N G E D G T I Q G F		110
AAGCGATTGTTTTCCCTGTTTTACATGGGCCAAATGGTGAAGATGGAACAATTCAAGGAT		360
M E T I N M P Y V G A G V L A S V N A M		130
TCATGGAAACCATTAAATATGCCTTATGTAGGCGCGGGTGTCTTAGCTAGCGTTAACGCAA		420
D K I M T K Y L L Q T V G I P Q V P F V		150
TGGACAAAATCATGACGAAATATCTTTACAAACTGTTGGCATTCCACAAGTACCATTG		480
P V L R S D W K G N P K E V F E K C E G		170
TGCCAGTTTTTAAGAAGTGACTGGAAAGGAAATCCAAAAGAAGTCTTTGAAAAATGTGAAG		540
S L I Y P V F V K P A N M G S S V G I S		190
GTTCTTTAATTTATCCGGTCTTTGTTAAACCTGCCAATATGGGTCTAGTGTCCGAATTA		600
K V E N R E E L Q E A L E E A F R Y D A		210
GCAAAGTGGAAAATCGTGAAGAATTGCAAGAAGCATTGGAAGAAGCTTCCGTTATGATG		660
R A I V E Q G I E A R E I E V A I L G N		230
CCCGAGCAATTGTTGAACAAGGGATCGAAGCACGTGAAATTGAAGTAGCCATTTTAGGAA		720
E D V R T T L P G E V V K D V A F Y D Y		250
ATGAAGATGTCCGTACGACTTTACCTGGTGAAGTGGTGAAGATGTCGCTTTCTATGATT		780
D A K Y I N N T I E M Q I P A H V P E E		270
ATGATGCAAAATACATCAATAACACGATTGAAATGCAAAATCCCAGCGCATGTTCCAGAAG		840
V A H Q A Q E Y A K K A Y I M L D G S G		290
AAGTAGCTCATCAAGCGCAAGAATACGCTAAAAAAGCGTATATTATGTTAGATGGAAGTG		900
L S R C D F F L T S K N E L F L N E L N		310
GCTTAAGTCGCTGTGATTTCTTCTTAACAAGCAAAAACGAATTATTCCTGAATGAATTGA		960
T M P G F T D F S M Y P L L W E N M G L		330
ACACCATGCCTGGTTTTACTGACTTTAGTATGTATCCTTTACTGTGGGAAAATATGGGCT		1020
K Y S D L I E E L I Q L A L N R F K *		348
TGAAATACAGTGATTTAATTGAGGAACTGATTCAGTTAGCTTTGAATCGTTTTAAATAA		1079

FIGURE 4

FEUILLE DE REMPLACEMENT (REGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ational Application No

CT/FR 93/01264

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 C12N15/31 C12Q1/68 G01N33/569 C12P21/08 C12N15/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 C07K G01N C12P C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 07942 (INSTITUT PASTEUR) 14 May 1992 see the whole document ---	9,12, 21-23
X	GENE vol. 112, no. 1, 1 March 1992, AMSTERDAM NL pages 53 - 58 DUTKA-MALEN, S. ET AL. 'Sequence of the vanC gene of Enterococcus gallinarum BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance' cited in the application see figure 1 --- -/--	9,12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April 1994

Date of mailing of the international search report

02 06 94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel.: (+31-70)-340-2040; Tx: 31-651-epo nl;
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

/FR 93/01264

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS vol. 70, no. 1, 15 June 1990, AMSTERDAM, NL pages 101 - 106 AL-OBEID, S. ET AL. 'Comparison of vancomycin-inducible proteins from four strains of Enterococci' cited in the application	1-2, 18-19
A	* page 102, paragraphs 3.3 et 3.4 * * page 104 - 105, paragraph 4.3 *	1-17
A	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY vol. 34, no. 10, October 1990 pages 1875 - 1879 DUTKA-MALEN, S. ET AL. 'Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in Gram-positive bacteria' cited in the application see page 1876, right column, line 63 - page 1877, left column, paragraph 1 see page 1878, left column, last paragraph - right column, line 14 * table 1, groupe 2 *	1-17
P,X	GENE vol. 124, no. 1, 14 February 1993, AMSTERDAM NL pages 143 - 144 EVERS, D. ET AL. 'The vanB gene of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC' see the whole document	1-17
T	GENE vol. 140, no. 1, 11 March 1994, AMSTERDAM NL pages 97 - 102 EVERS, S. ET AL. 'Sequence of the vanB and ddl genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis V583'	

Information on patent family members

PCT/FR 93/01264

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 unde Internationale No
T/FR 93/01264

 A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 5 C12N15/31 C12Q1/68 G01N33/569 C12P21/08 C12N15/52

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 C07K G01N C12P C12N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,92 07942 (INSTITUT PASTEUR) 14 Mai 1992 voir le document en entier ---	9,12, 21-23
X	GENE vol. 112, no. 1, 1 Mars 1992, AMSTERDAM NL pages 53 - 58 DUTKA-MALEN, S. ET AL. 'Sequence of the vanC gene of Enterococcus gallinarum BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance' cité dans la demande voir figure 1 --- -/--	9,12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Avril 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02.06.94

 Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Andres, S

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS vol. 70, no. 1, 15 Juin 1990, AMSTERDAM, NL pages 101 - 106 AL-OBEID, S. ET AL. 'Comparison of vancomycin-inducible proteins from four strains of Enterococci' cité dans la demande	1-2, 18-19
A	* page 102, paragraphes 3.3 et 3.4 * * pages 104 à 105, paragraphe 4.3 * ---	1-17
A	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY vol. 34, no. 10, Octobre 1990 pages 1875 - 1879 DUTKA-MALEN, S. ET AL. 'Phenotypic and genotypic heterogeneity of glycopeptide resistance determinants in Gram-positive bacteria' cité dans la demande voir page 1876, colonne de droite, ligne 63 - page 1877, colonne de gauche, alinéa 1 voir page 1878, colonne de gauche, dernier alinéa - colonne de droite, ligne 14 * tableau 1, groupe 2 * ---	
P,X	GENE vol. 124, no. 1, 14 Février 1993, AMSTERDAM NL pages 143 - 144 EVERS, D. ET AL. 'The vanB gene of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis V583 is structurally related to genes encoding D-Ala:D-Ala ligases and glycopeptide-resistance proteins VanA and VanC' voir le document en entier ---	1-17
T	GENE vol. 140, no. 1, 11 Mars 1994, AMSTERDAM NL pages 97 - 102 EVERS, S. ET AL. 'Sequence of the vanB and ddl genes encoding D-alanine:D-lactate and D-alanine:D-alanine ligases in vancomycin-resistant Enterococcus faecalis V583' -----	

Renseignements relatifs aux familles de brevets

LT/FR 93/01264

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)



.

.